

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. März 2001 (29.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/21660 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 14/705,
7/08, A61P 37/00

(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22
41, 50462 Köln (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/09241

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
21. September 2000 (21.09.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
99118630.5 ✓ 21. September 1999 (21.09.1999) EP
99118631.3 ✓ 21. September 1999 (21.09.1999) EP

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US*): AFFINA IMMUNTECHNIK GMBH [DE/DE];
Volmerstrasse 5, 12489 Berlin (DE).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): RÖNSPECK, Wolf-
gang [DE/DE]; Mainzer Strasse 25, 10715 Berlin (DE).
KUNZE, Rudolf [DE/DE]; Hessenhagen 2, 17268
Stegelitz (DE). WALLUKAT, Gerd [DE/DE]; Wolkenste-
instrasse 4, 13129 Berlin (DE). DIERENFELD, Manuela
[DE/DE]; Wildrosenstrasse 1, 15827 Blankenfelde (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: PEPTIDES FOR COMBATING THE AUTOANTIBODIES THAT ARE RESPONSIBLE FOR DILATATIVE CAR-
DIOMYOPATHY (DCM)

(54) Bezeichnung: PEPTIDE GEGEN DCM HERVORRUFENDE AUTOANTIKÖRPER

(57) Abstract: The invention relates to peptides for combating the autoantibodies that have a causal pathological relationship with
dilatative cardiomyopathy (DCM). Said peptides can be e.g. bonded to a solid phase. Said autoantibodies can be eliminated by
treating the blood of patients with DCM with the inventive peptides.

(57) Zusammenfassung: Es werden Peptide beschrieben, die Autoantikörper, die mit Dilatativer Cardiomyopathie (DCM) in kausal
pathologischer Verbindung stehen. Die Peptide können z.B. an eine feste Phase gebunden werden. Durch Behandlung von Blut der
Patienten mit DCM und den erfindungsgemäßen Peptiden, können Autoantikörper entfernt werden.



WO 01/21660 A1

Peptide gegen DCM hervorrufende Autoantikörper

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Peptide gegen DCM hervorrufende Autoantikörper, Arzneimittel enthaltend diese Peptide, Verwendung der Peptide, Verfahren zur Behandlung von mit β_1 -adrenerg aktiven Autoantikörpern in Verbindung stehenden Erkrankungen sowie eine Vorrichtung zur Immunadsorption, enthaltend die an eine Festphase gebundenen Peptide.

Das Immunsystem ist ein essentieller Bestandteil bei allen tierischen Lebewesen. Bei den Säugetieren dient es insbesondere zur Abwehr von Mikroorganismen, zur Geweberegeneration und zur Vernichtung von Tumorzellen. In der klassischen Immunologie wird unterschieden zwischen einer zellulären und einer humoralen Immunabwehr. Darunter versteht man zwei unterscheidbare, aber miteinander kooperierende Systeme, die letztlich das Immunsystem darstellen.

Es existieren eine Reihe von Krankheiten, die auf Grund ihrer Pathogenese als Autoimmunerkrankungen angesehen werden. Bei solchen Krankheiten richtet sich das Immunsystem der Betroffenen gegen eigene Organe, Gewebe, Zellen oder Proteine u.a. Moleküle. Zu den vorwiegend zellvermittelten Autoimmunerkrankungen gehören Multiple Sklerose und Diabetes (Typ I).

Eine zweite Gruppe bilden die vorzugsweise antikörpervermittelten Autoimmunerkrankungen. Zu ihnen zählen beispielsweise Rheuma, die seltener vorkommenden Autoimmunerkrankungen wie Myasthenia gravis oder Lupus erythematodes und neuerdings auch die Dilatative Cardiomyopathie (DCM).

Die Pathogenese der meisten Autoimmunerkrankungen ist unbekannt. Es gibt verschiedene Hypothesen und Modelle, wie man die Entstehung von Autoimmunerkrankungen erklären kann. Ein Erklärungsmodell stellt das antigene/molekulare Mimikry dar. Hierbei geht man davon aus, dass Mikroorganismen, z.B. Viren oder Parasiten, sich mit bestimmten Molekülen ausstatten, die z.B. wirtseigenen Strukturen täuschend ähnlich oder sogar teilweise mit ihnen

identisch sind und folglich vom Immunsystem des Wirtes nicht erkannt werden.

Werden sie allerdings als fremd erkannt und werden gegen sie Antikörper produziert, erkennen diese Antikörper dann körpereigene, ähnliche Strukturen, mit der Folge, dass das Immunsystem und das Komplementsystem aktiviert werden. Dieses löst dann vor Ort pathologische Reaktionen im Gewebe - z.B. chronische Entzündungen - aus oder aber es kommt zu einer pathologischen Fehlfunktion der Zellen, an denen die Autoantikörper gebunden haben.

Als ein herausragendes Beispiel hierfür kann die Dilatative Cardiomyopathie gelten. Bei dieser Autoimmunerkrankung bildet der Organismus fehlerhaft Autoantikörper, die an definierte Bereiche des β_1 -adrenergen Rezeptors binden. Diese Bereiche befinden sich auf dem ersten und zweiten Loop von insgesamt drei extrazellulären Loops des β_1 -adrenergen Rezeptors.

Solche Autoantikörper, die in der Lage sind, an diese Bereiche zu binden, erzeugen in biologischen Tests an Ratten-Cardiomyozyten in der Zellkultur (diese Zellen haben einen nahezu identischen β_1 -adrenergen Rezeptor auf der Oberfläche) eine Erhöhung der Pulsationsrate. Man spricht hier von einer pharmakoaktiven, dem Adrenalin ähnlichen Wirkung der Autoantikörper. Die Autoantikörper, die gegen die Epitope auf den Loops 1 und 2 des β_1 -adrenergen Rezeptors gerichtet sind, werden vor allem bei Patienten mit DCM beobachtet. Gelegentlich werden solche Autoantikörper auch bei Patienten mit Herzrhythmusstörungen und Myocarditis beobachtet.

Die Dilatative Cardiomyopathie ist eine Autoimmunerkrankung, die unbehandelt zu einer starken Beeinträchtigung der Herzleistung - Reduktion der Pumpleistung bei gleichzeitiger Ausdehnung des Herzmuskelgewebes durch Infiltrate - und zur Herztransplantation oder zum Tod führt.

Werden allerdings dem Patienten durch eine Blutwäsche die Antikörper aus

dem Blut entfernt, kommt es im Laufe eines Jahres zu einer Regeneration des Herzmuskels und zu einer drastischen Verbesserung der Herzmuskelleistung, die beinahe wieder die Werte von gesunden Personen erreicht.

Bei Patienten mit DCM lässt sich aus dem Plasma eine Immunglobulinfraktion isolieren, welche die spezifische Autoantikörper enthält, die an den β_1 -adrenergen Rezeptor binden und darüber die Zelle aktivieren. Fügt man der Zellkultur von Rattencardiomyocyten Peptide des β_1 -adrenergen Rezeptors hinzu, welche die Bindungsstelle für die Autoantikörper darstellen, lässt sich der pathologische Effekt der Immunglobulinfraktion aufheben.

Werden dieselben Peptide, welche den nativen Sequenzen entsprechen an eine Festphase gekoppelt, sind sie nicht in der Lage, aus dem Blutplasma eines Patienten die beschriebenen Autoantikörper zu binden und zu eliminieren. D.h. das Peptid, die der nativen Sequenz der β_1 -adrenergen Rezeptors entsprechen und Bindungsstellen für die beschriebenen pathologischen Autoantikörper darstellen nicht für die Immunadsorption zu verwenden sind.

Ein der Erfindung zu Grunde liegendes technisches Problem besteht darin, Peptide bereitzustellen, die pathologische Autoantikörper, die gegen funktionelle Epitope gerichtet sind aus dem Blut oder Plasma von Patienten mit positivem Antikörperstatus oder DCM erkennen, binden und eliminieren und wobei die Peptide gleichzeitig neben dem jeweils die Antikörperwirkung neutralisierenden Epitope noch Aminosäuresequenzen enthalten, die eine Bindung der pathologischen Antikörper ermöglichen.

Gelöst wird das Problem überraschenderweise durch Peptide mit der Aminosäuresequenz

X01-X02-X03-G-X04-X05-X06-X07-X08-X09-W-X10-X11-X12

wobei

- 4 -

X01 = Aminogruppe, Acetylgruppe, Biotingruppe, Fluoreszenzmarker, Spacer, Linker oder Deletion

X02 = D,G,E,T, S oder Deletion,

X03 = W,Y,F,G,T

X04 = T,S,A,G

X05 = L,F,Y,W

X06 = V,I,W,F,Y

X07 = S,A,C

X08 = G,D,E,N,Q

X09 = F,L,I,Y,

X10 = E,Q,T,S,L

X11 = Y,F,T,S,W

X12 = Amid, die freie Säure, GKK, oder ein Spacer ist

und Peptide mit der Aminosäuresequenz

X01-X02-W-X03-R-X04-X05-X06-X07-X08-E-A-R-X09-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17

wobei

X01 = Aminogruppe, Aminosäure, Peptid, Acetylgruppe, Biotingruppe, Fluoreszenzmarker, Spacer, Linker oder Deletion

X02 = H, E, Q,

X03 = H, F, Y, W

X04 = A, V

X05 = G, T, E, S, D, N

X06 = S, H, A

X07 = D, N, Q, E

X08 = G, A, oder eine Deletion

X09 = D, N, R

X10 = S, T, C, M

X11 = H, F, W, Y

X12 = A, D, N, S

X13 = D, N

X14 = E, P

X15 = R, K, T

X16 = S, T, C, M oder eine Deletion

X17 = Amid, die freie Säure GKK, SGKK oder ein Spacer ist.

Insbesondere werden erfindungsgemäße Peptide mit der folgenden Aminosäuresequenz eingesetzt:

X01-X02-X03-G-X04-X05-X06-X07-X08-X09-W-X10-X11-X12

wobei

X01 = Aminogruppe, Acetylgruppe, Biotingruppe, Fluoreszenzmarker, Spacer, Linker oder Deletion

X02 = D, E, T, oder Deletion,

X03 = W, Y, T

X04 = T, S,

X05 = L, F,

X06 = V, F,

X07 = S,

X08 = G,D,E,

X09 = F,L,

X10 = E,Q,T,L

X11 = Y,T,S,

X12 = Amid, die freie Säure, GKK, oder ein Spacer ist,

und Peptide mit der Aminosäuresequenz,

X01-H-W-X03-R-A-X05-S-D-X08-E-A-R-R-S-Y-X12-D-P-X15-X16-X17

wobei

X01 = Aminogruppe, Aminosäure, Peptid, Acetylgruppe, Biotingruppe, Fluoreszenzmarker, Spacer, Linker oder Deletion

X03 = Y, W

X05 = T, E,

X08 = G, oder eine Deletion

X12 = A, N,

X15 = K, T

X16 = S, oder eine Deletion

X17 = Amid, die freie Säure GKK, SGKK oder ein Spacer ist.

Insbesondere bevorzugt werden die folgenden Peptide eingesetzt, die ausgewählt sind aus der Gruppe

-TGSFFSELWTSR²,

EYGSFFSELWTSR²,

TYGTLFSDFWLSR²,

DWGTLVSGFWEYR²,

DWGTLFSDFWQTR²,

wobei R² ein Säureamid, eine freie Säure oder GK³ bedeutet und wobei R³ ein Säureamid oder eine freie Säure ist,

mit der Maßgabe, dass pro Aminosäureposition in der Sequenz maximal ein nichtkonservativer Aminosäureaustausch vorgenommen wird, wobei unter nichtkonservativem Austausch ein Austausch von Aminosäuren zwischen den nachstehend genannten Gruppen verstanden wird:

Gruppe I: Leu, Ile, Val, Met, His, Trp, Tyr, Phe,

Gruppe II: Glu, Gln, Asp, Asn,

Gruppe III: Ser, Thr, Cys, Gly, Ala, Pro,

Gruppe IV: Lys, Arg,

und

Peptide ausgewählt aus der Gruppe

HWWRAESD-EARRSYNDPK-R²,

HWYRATSDGEARRSYADPTSR²,

mit der Maßgabe, dass pro Aminosäureposition in der Sequenz maximal zwei nichtkonservative Aminosäureaustausche vorgenommen werden, wobei unter nichtkonservativem Austausch ein Austausch von Aminosäuren zwischen den nachstehend genannten Gruppen verstanden wird:

Gruppe I: Leu, Ile, Val, Met, His, Trp, Tyr, Phe,

Gruppe II: Glu, Gln, Asp, Asn,

Gruppe III: Ser, Thr, Cys, Gly, Ala, Pro,

Gruppe IV: Lys, Arg.

Insbesondere bevorzugt werden die folgenden Peptide:

TGSFF SELWT SGKK-amid oder freie Säure, (Seq. Id. Nr. 1)

E YGSFF SELWT SGKK-amid oder freie Säure, (Seq. Id. Nr. 2)

T YGTLF SDFWL SGKK-amid oder freie Säure, (Seq. Id. Nr.3)

His-Trp-Trp-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Ser-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-
Amid oder freie Säure, (Seq. Id. Nr.4)

Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Amid oder freie Säure, (Seq. Id. Nr. 5)

D WGTLV SGFWE Y amid oder freie Säure, (Seq. Id. Nr. 6)

D WGTLF SDFWQ TGKK amid oder freie Säure, (Seq. Id. Nr. 7)

H WYRAT SDGEA RRSYA DPTSG KK-amid oder freie Säure, (Seq. Id. Nr. 8)

HWWRAESDEARRSYNDPKC-amid oder freie Säure, (Seq. Id. Nr. 9)

oder die jeweils N-terminal acetyliert sind,

handelt.

Der Fachmann weiß, dass bei Peptiden oder Proteinen Aminosäureposition konservativ ausgetauscht werden können, ohne die Funktion zu beeinträchtigen. Im vorliegenden Fall wird unter „konservativem“ Austausch ein Austausch der Aminosäuren innerhalb der nachstehend aufgeführten Gruppen verstanden:

Gruppe I: Leu, Ile, Val, Met, His, Trp, Tyr, Phe,

Gruppe II: Glu, Gln, Asp, Asn,

Gruppe III: Ser, Thr, Cys, Gly, Ala, Pro,

Gruppe IV: Lys, Arg.

Die erfindungsgemäßen Peptide werden insbesondere von Antikörpern von Patienten mit Dilatativer Cardiomyopathie gebunden.

Erfindungsgemäß können als Linker alle Strukturen, die zu diesem Zweck verfügbar sind, eingesetzt werden, solange diese nicht negativ mit dem Bindungsverhalten der Peptide gegenüber den Antikörpern interferieren. Ein Linker ist üblicherweise eine chemische Verbindung, welche mindestens eine Verknüpfungsstelle (funktionelle Gruppe) an einer ansonsten funktionslosen polymeren Matrix bereitstellt.

Die Verknüpfungsstelle dient zur Kopplung eines Liganden oder eines Spacers und korrespondiert mit den chemischen Eigenschaften des Liganden oder Spacers. Diese Verknüpfung ist in Abhängigkeit von der Art des Linkermoleküls stabil oder spaltbar.

Ein Ligand ist üblicherweise eine Verbindung mit einer besonderen Eigenschaft. Erfindungsgemäß bevorzugt handelt es sich um ein Peptid, welches in der Lage ist, spezifisch einen Autoantikörper zu binden, der eine adrenerge Wirkung besitzt und gegen den β_1 -adrenerge-Rezeptor des Herzmuskels gerichtet ist.

Erfindungsgemäß werden die folgenden Linker bevorzugt eingesetzt:

α -Aminocarbonsäuren sowie deren Homo- und Heterooligomere, α,ω -Aminocarbonsäuren sowie deren verzweigte Homo- oder Heterooligomere, sonstige Aminosäuren sowie die linearen und verzweigten Homo- oder Heterooligomere (Peptide); Amino-oligoalkoxy-alkylamine; Maleinimidocarbonsäure-Derivate; Oligomere von Alkylaminen; 4-Alkylphenyl-Derivate; 4-Oligoalkoxyphenyl- oder 4-Oligoalkoxyphenoxy-Derivate; 4-Oligoalkylmercaptophenyl- oder 4-Oligoalkylmercaptophenoxy-Derivate; 4-Oligoalkylaminphenyl- oder 4-Oligoalkylaminophenoxy-Derivate; (Oligoalkylbenzyl)-phenyl- oder 4-(Oligoalkylbenzyl)-phenoxy-Derivate sowie 4-(Oligoalkoxybenzyl)-phenyl- oder 4-(Oligoalkoxybenzyl)-phenoxy-Derivate; Trityl-Derivate; Benzylxyaryl- oder Benzylalkoxyalkyl-Derivate; Xanthen-3-yl-alkoxyalkyl-Derivate; (4-Alkylphenyl)- oder ω -(4-Alkylphenoxy)-alkansäure-Derivate; Oligoalkyl-phenoxyalkyl- oder Oligoalkoxy-phenoxyalkyl-Derivate;

Carbamat-Derivate; Amine; Trialkylsilyl- oder Dialkyl-alkoxysilyl-Derivate; Alkyl- oder Aryl-Derivate und Kombinationen davon.

Zum Einsatz der erfindungsgemäßen werden diese insbesondere an eine Festphase gebunden. Vorzugsweise erfolgt die Bindung der Peptide über einen Spacer an die Festphase. Als Spacer kommen praktisch alle für diese Funktion geeigneten chemischen Verbindungen oder Gruppen in Betracht, so lange sie nicht das Bindungsverhalten so negativ beeinflussen, dass eine Bindung des Antikörpers mit dem Peptid verhindert oder wesentlich beeinträchtigt wird.

Ein Spacer ist üblicherweise eine Verbindung, die falls nötig zwischen Ligand und Linker eingebaut wird und dazu dient, den Liganden im für die Bindung des Autoantikörpers richtigen Abstand und richtigen räumlichen Lage zu positionieren. Spacer sind Moleküle mit mindestens zwei chemisch aktiven Gruppen (funktionelle Gruppen), wovon eine Gruppe an das Linkermolekül bindet und mindestens eine zweite funktionelle Gruppe die Bindung zu einem Liganden herstellt. Durch die Auswahl des Spacers kann je nach Bedarf eine Erhöhung der Flexibilität sowie eine Verbesserung der Zugänglichkeit als auch eine gerichtete Anordnung der Liganden und Erhöhung der Ligandendichte auf der Oberfläche erreicht werden.

Spacer sind z.B. ω -Aminocarbonsäuren sowie deren Homo- und Heterooligomere, α,ω -Aminocarbonsäuren sowie deren verzweigte Homo- oder Heterooligomere, sonstige Aminocarbonsäuren sowie deren lineare und verzweigte Homo- oder Heterooligomere, Maleinimidocarbonsäurederivate, Hydroxycarbonsäurederivate, Dicarbonsäurederivate, Diaminderivate, Dihydroxyalkylderivate und Hydroxyalkylaminderivate. Vorzugsweise werden Mono- oder Dioligomere von β -Alanin oder ω -Aminohexansäure und verzweigte Mono- oder Dioligomere von Lysin oder Ornithin verwendet. Dem Fachmann ist die Technologie, in der Peptide an feste Phasen verankert werden können, an sich bekannt.

In einer anderen Ausführungsform der Erfindung, werden die erfindungsgemäßen Peptide als Arzneimittel eingesetzt.

Bei dieser Konzeption werden Peptide in einer besonderen Weise so verändert (z.B. durch Zyklisierung), dass sie durch Serumproteasen nicht zerstört werden können und in Lösungen Antikörper binden. Auf diese Weise kann eine in vivo-Neutralisation der Antikörper stattfinden, in dem man die entsprechend aufbereiteten Peptide intravenös verabreicht. Die Peptide sind hier als Arzneimittel aufzufassen. Ihre Entwicklung leitet sich direkt aus den die antikörperbindenden Peptiden, welche säulenmatrixfixiert sind, ab.

Die Menge der zu verabreichenden Peptide hängt dabei von ihrem Molekulargewicht (also ihrer Größe) sowie von der Konzentration von in der Blutbahn und anderen Kompartimenten erreichbaren Autoantikörpern ab. Nach bisherigem Kenntnisstand bewegen sich die Mengen von Autoantikörpern in μg und ng-Bereich. Eine Menge zwischen 1-5 μg Peptid sollte ausreichen die vorhandenen Antikörper zu binden und diese einer Elimination als Immunkomplex entsprechend der natürlichen Clearancemechanismen zu zuführen. In der Folge kann das niedriger dosiert werden, müssen doch nur nachgebildete Antikörper eliminiert werden.

Prinzipiell sind auch hier andere Darreichungsformen möglich. Bei Anwendung entsprechender galenischer Verfahren sollte eine Resorption von β_1 -antikörperbindenden Peptiden erreicht werden. Hier wären die Dosierungen dann vorzugsweise etwa um den Faktor 10 bis 20, höher.

Die erfindungsgemäßen Peptide können zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung mit von mit β_1 -adrenerg aktiven Autoantikörpern in Verbindung stehenden Erkrankungen, insbesondere Dilatative Cardiomyopathie, Bluthochdruckerkrankungen und eine durch Trypanosoma cruzi induzierte Form der Cardiomyopathie eingesetzt werden. Neben der Dilatativen Cardiomyopathie existieren noch eine Reihe von Erkrankungen, die den Autoimmunerkrankun-

gen zugeordnet werden können und die ähnlichen Pathomechanismen unterliegen. Für die Präeklampsie und bestimmte Formen des malignen Bluthochdrucks wurden ebenfalls Autoantikörper beschrieben, welche durch eine Stimulation des Angiotensin-Rezeptors bzw. des α_1 -Rezeptors von Zellen zu deren Überaktivierung beitragen und die an der Entstehung von definierten Krankheitsbildern beteiligt sind. Die Anwendung von Peptiden zur Elimination von diesen speziellen Autoantikörpern bzw. zur in vivo-Neutralisation der Autoantikörper ist hier in Analogie zur Dilatativen Cardiomyopathie zu sehen.

Erfindungsgemäß beansprucht wird ein Verfahren zur Behandlung von mit β_1 -adrenerg aktiven Autoantikörpern in Verbindung stehenden Erkrankungen durch Entfernung der Autoantikörper mittels von an eine Festphase gebundenen Peptiden. Dies kann vorteilhafterweise mit einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Chromatographie enthaltend die an eine Festphase gebundenen erfindungsgemäßen Peptide erfolgen.

Die Peptide befinden sich festphasenfixiert, z.B. an Sepharose, in einem geschlossenen, sterilen Behälter, der in der Regel zwischen 5 und 250ml Volumen hat. In diesem Sterilraum fließt das Blutplasma der Patienten, von dem zuvor die Zellen durch eine medizintechnische Apparatur entfernt worden sind, über bzw. durch die Adsorptionsmatrix, d. h. die peptidbeschichteten Sepharose-Oberfläche. Hierbei kommt es zu einer Bindung der pathologischen Autoantikörper an die Peptide, welche Regionen des β_1 -adrenergen Rezeptors simulieren. Sofern geeignete Adsorptionsmatrices eingesetzt werden, kann auf eine vorherige Abtrennung der Zellen verzichtet werden.

Die restlichen Bestandteile des Blutplasmas oder Blutes, so auch alle notwendigen und nützlichen Immunglobuline verlassen dann die Säule und werden dem Patienten wieder in die Blutbahn gegeben. Diese Vorrichtung zur extrakorporalen Therapie ist Stand der Technik so weit es dabei um eine unspezifische Elimination von Plasmaproteinen oder Immunglobulin geht.

Die erfindungsgemäße Einrichtung bedient sich der Peptide, die vom β_1 -adrenergen Rezeptor abgeleitet worden sind, um die kleine aber pathologisch relevante Autoantikörperfraktion aus dem Plasma zu entfernen.

Nach dem Durchfluss einer bestimmten Menge an Blutplasma kann der Blutplasmastrom auf eine zweite technisch identische Säule umgeleitet werden, während die erste Säule regeneriert wird. D. h. die beladenen Antikörper werden vom Peptid abgetrennt und verworfen, indem verschiedene Spül- und Elutionslösungen, vorzugsweise physiologischer Kochsalzlösung mit und ohne zusätzliche Pufferung beispielsweise durch Phosphat, Glycin oder Citrat und einen pH-Bereich von pH 2 bis pH 7,5 verwendet werden. Die auf diese Weise wieder regenerierte Säule steht anschließend erneut für die Bindung und Elimination der pathologischen Autoantikörper aus dem Blutplasma des Patienten zur Verfügung. Dieses Doppelsäulenprinzip hat sich bewährt und wird immer dort angewendet wo eine Regeneration der Säule erforderlich ist.

Eine zweite Variante der Anwendung von Peptiden zur Elimination pathologischer Autoantikörper beinhaltet die Verwendung von Einmalsäulen. Bei diesen Säulen befindet sich soviel Peptid auf der Festphasenmatrix, dass in einer mehrstündigen Behandlung große Teile der Autoantikörper aus dem Plasma entfernt werden können. Der Vorteil liegt hier in dem Verzicht auf die zeitaufwendige und umständliche Regeneration der Adsorptionsmatrix.

Eine dritte Variante der Behandlung von DCM-Patienten durch Elimination pathologischer Antikörper aus dem Blutplasma liegt in der Verwendung von Säulen, bei denen aufgrund ihrer Beschaffenheit eine vorherige Trennung von Plasma und Blutzellen nicht erforderlich ist.

Für die Verwendung der Säulen sind technische Vorrichtungen erforderlich, welche durch verschiedene Schläuche, Pumpen, Monitore und andere Überwachungssysteme einen der Behandlung adäquaten Blut- bzw. Plasmazufuss und -durchfluss garantieren.

Ausführungsbeispiel

1. Peptide

Die nachstehenden zwei Peptide wurden an quervernetzten Agarose-Beads, Sepharose 4B als Festphase immobilisiert.

Peptid 1: TGSFFCELWTSGKK

Peptid 2: HWWRAESDEARRSYNDPKC

Als Füllmatrix diente Sepharose CL4B. Aus den beiden Peptidmatrizes und der Füllmatrix wurde eine Affinitätschromatographiesäule hergestellt und diese mit Humanplasma als Probe auf ihre Funktion, der Entfernung von DCM assoziierten Autoantikörpern aus Humanplasma, geprüft.

2. Immobilisierung der Peptide

Zur Immobilisierung an einer Festphase wurden die Peptide zu einer Konzentration von 2 mg/mL in Kopplungspuffer (0,5 M NaCl, 0,1 M NaHCO₃ pH 8,3) gelöst und mit gewaschener und CNBr voraktivierter Sepharose 4B gemischt. Nach Beendigung der Kopplungsreaktion wurden die Peptidmatrizes mit Kopplungspuffer gewaschen und die überschüssigen CNBr-Gruppen inaktiviert.

Die Peptidbeladung der Matrizes wurde photometrisch durch Differenzbildung der eingesetzten Peptidmasse vor und der nicht-immobilisierten Peptidmasse nach der Kopplung bestimmt.

Die Matrixbeladung mit Peptid 1 betrug 2,0 mg Peptid/ml Matrix. Die Matrixbeladung mit Peptid 2 betrug 1,8 mg Peptid/ml Matrix.

Zur Herstellung der Affinitätschromatographiesäule wurden Peptidmatrix 1 und Peptidmatrix 2 im Verhältnis 1 : 1 gemischt und diese Mischung im Verhältnis 1 : 5 mit Füllmatrix versetzt. Das Gesamtvolumen der Matrix für die Affinitätschromatographiesäule betrug 100 ml.

3. Entfernung DCM-assoziierter Autoantikörper aus Humanplasma

Die oben beschriebene Affinitätschromatographiesäule wurde an zwei DCM-erkrankten Personen mit positivem Nachweis von DCM-assozierten Autoantikörpern auf ihre Funktion getestet.

Vor Anwendung müssen die Personen mit Antikoagulantien wie Heparin, Hirudin oder Citrat behandelt werden.

Dafür wurde aus dem empfohlenen Konzentrationsbereich von 1500 bis 3000 Einheiten ein Bolus Heparin von 2000 Einheiten zur intravenösen Verabreichung gewählt. Während der Anwendung wurde aus dem empfohlenen Konzentrationsbereich von 250 bis 750 Einheiten Heparin pro Stunde eine Dosis von 500 Einheiten Heparin pro Stunde zur intravenösen Verabreichung gewählt.

Das Blut wurde in einen Separator geleitet, in dem die Trennung der zellulären Bestandteile des Blutes vom Blutplasma erfolgte. Das Plasma der DCM-autoantikörper-positiven Personen wurde über die affinitätschromatographische Säule geleitet. Das Volumenverhältnis der Affinitätsmatrix zu Plasma betrug zwischen 1 : 6 bis 1 : 10 für die durchgeführten affinitätschromatographischen Säulenläufe. Insgesamt wurden 20 solche Reinigungszyklen durchgeführt, wobei nach jedem Zyklus das behandelte Plasma den Personen zusammen mit den zellulären Bestandteilen des Blutes reinfundiert wurde. Die Gesamtzahl der Reinigungszyklen von 20 ergibt sich aus 4 Reinigungszyklen pro Anwendungstag bei insgesamt 5 Anwendungstagen.

4. Quantitativer Nachweis der DCM-assozierten Autoantikörper

Der quantitative Nachweis der DCM-assozierten Autoantikörper erfolgte aus Plasmaproben der an DCM-erkrankten Personen, die vor und nach der Anwendung an jedem Behandlungstag gewonnen wurden. Der Nachweis der DCM-assozierten Autoantikörper (Antikörper gegen den β_1 adrenergen Rezeptor)

erfolgte nach Wallukat, G., Wollenberger, A., Morwinski, R. and Pitschner, H.F. (1995).- Anti- β_1 -adrenoceptor antibodies with chronotropic activity from the serum of patients with dilated cardiomyopathy: mapping of epitopes in the first and second extracellular loops. J. Mol. Cell. Cardiol. 27, 397-406.

5. Ergebnisse der Entfernung DCM-assoziierter Autoantikörper aus Humanplasma

Für Person 1 mit Autoantikörper, die bevorzugt Peptid 1 binden, wurde nach Beendigung der Gesamtanwendung eine Reduktion des Autoantikörpers auf 12% des Ausgangswerts erreicht.

Für Person 2 mit Autoantikörper, die bevorzugt Peptid 2 binden, wurde nach Beendigung der Gesamtanwendung eine Reduktion des Autoantikörpers auf 5% des Ausgangswerts erreicht.

Die Ergebnisse für die Gesamtanwendung sind in Tabelle 1 dargestellt.

Bei beiden Personen waren die Konzentrationen weiterer Plasmaparameter wie z.B. Gesamteiweiß,

Albumin und IgG während der Gesamtanwendung nahezu unbeeinflusst.

Tabelle 1: DCM-assozierte Autoantikörper (Antikörper gegen den β_1 adrenergen Rezeptor) im Humanplasma von Person 1 und Person 2 vor, während und nach Behandlung mit der Affinitätschromatographiesäule.

Die an die affinitätschromatographischen Säule gebundenen Autoantikörper wurden, nach Elution von der Affinitätsmatrix, über festphasengebundenes Peptid 1 sowie Peptid 2 auf ihre bevorzugte Bindung an Peptid 1 oder Peptid 2 überprüft. Autoantikörpertyp 1 bevorzugt die Bindung von Peptid 1 und Autoantikörpertyp 2 bevorzugt die Bindung von Peptid 2.

Person 1

Plasmaprobe	Autoantikörper 2 [rel. Einheiten]	Autoantikörper 2 [%]
vor Zyklus 1-4	5,8	100
nach Zyklus 1-4	2,4	41
vor Zyklus 5-8	3,4	59
nach Zyklus 5-8	1,6	28
vor Zyklus 9-12	3,3	57
nach Zyklus 9-12	2,0	34
vor Zyklus 13-16	1,9	33
nach Zyklus 13-16	0,8	14
vor Zyklus 17-20	1,7	29
nach Zyklus 17-20	0,7	12

Person 2

Plasmaprobe	Autoantikörper 1 [rel. Einheiten]	Autoantikörper 1 [%]
vor Zyklus 1-4	6,1	100
nach Zyklus 1-4	3,1	51
vor Zyklus 5-8	3,8	62
nach Zyklus 5-8	3,0	49
vor Zyklus 9-12	3,5	57
nach Zyklus 9-12	2,3	38
vor Zyklus 13-16	2,8	46
nach Zyklus 13-16	0,9	15
vor Zyklus 17-20	1,7	28
nach Zyklus 17-20	0,3	5

Patentansprüche**1. Peptide mit der Aminosäuresequenz**

X01-X02-X03-G-X04-X05-X06-X07-X08-X09-W-X10-X11-X12

wobei

X01 = Aminogruppe, Acetylgruppe, Biotingruppe, Fluoreszenzmarker, Spacer, Linker oder Deletion

X02 = D,G,E,T, S oder Deletion,

X03 = W,Y,F,G,T

X04 = T,S,A,G

X05 = L,F,Y,W

X06 = V,I,W,F,Y

X07 = S,A,C

X08 = G,D,E,N,Q

X09 = F,L,I,Y,

X10 = E,Q,T,S,L

X11 = Y,F,T,S,W

X12 = Amid, die freie Säure GKK, oder ein Spacer ist

und Peptide mit der Aminosäuresequenz

X01-X02-W-X03-R-X04-X05-X06-X07-X08-E-A-R-X09-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17

wobei

X01 = Aminogruppe, Aminosäure, Peptid, Acetylgruppe, Biotingruppe, Fluoreszenzmarker, Spacer, Linker oder Deletion

X02 = H, E, Q,

X03 = H, F, Y, W

X04 = A, V

X05 = G, T, E, S, D, N

X06 = S, H, A

X07 = D, N, Q, E

X08 = G, A, oder eine Deletion

X09 = D, N, R

X10 = S, T, C, M

X11 = H, F, W, Y

X12 = A, D, N, S

X13 = D, N

X14 = E, P

X15 = R, K, T

X16 = S, T, C, M oder eine Deletion

X17 = Amid, freie Säure, GKK, SGKK oder ein Spacer ist.

2. Peptid nach Anspruch 1 mit der Aminosäuresequenz

X01-X02-X03-G-X04-X05-X06-X07-X08-X09-W-X10-X11-X12

wobei

X01 = Aminogruppe, Acetylgruppe, Biotingruppe, Fluoreszenzmarker, Spacer, Linker oder Deletion

X02 = D, E, T, oder Deletion,

X03 = W, Y, T

X04 = T,S,

X05 = L,F,

X06 = V,F,

X07 = S,

X08 = G,D,E,

X09 = F,L,

X10 = E,Q,T,L

X11 = Y,T,S,

X12 = Amid, die freie Säure, GKK, oder ein Spacer ist,

und Peptide mit der Aminosäuresequenz,

X01-H-W-X03-R-A-X05-S-D-X08-E-A-R-R-S-Y-X12-D-P-X15-X16-X17

wobei

X01 = Aminogruppe, Aminosäure, Peptid, Acetylgruppe, Bio-
tingruppe, Fluoreszenzmarker, Spacer, Linker oder Deletion

X03 = Y, W

X05 = T, E,

X08 = G, oder eine Deletion

X12 = A, N,

X15 = K, T

X16 = S, oder eine Deletion

X17 = Amid, die freie Säure GKK, SGKK oder ein Spacer ist.

3. Peptide nach einem der Ansprüche 1 oder 2 ausgewählt aus der Gruppe

-TGSFFSELWTSR²,

EYGSFFSELWTSR²,
TYGTLFSDFWLSR²,
DWGTLVSGFWEYR²,
DWGTLFSDFWQTR²

R² ein Säureamid, eine freie Säure oder GKRR³ bedeutet, wobei R³ ein Säureamid oder eine freie Säure ist,

mit der Maßgabe, dass pro Aminosäureposition in der Sequenz maximal ein nichtkonservativer Aminosäureaustausch vorgenommen wird, wobei unter nichtkonservativem Austausch ein Austausch von Aminosäuren zwischen den nachstehend genannten Gruppen verstanden wird:

Gruppe I: Leu, Ile, Val, Met, His, Trp, Tyr, Phe,

Gruppe II: Glu, Gln, Asp, Asn,

Gruppe III: Ser, Thr, Cys, Gly, Ala, Pro,

Gruppe IV: Lys, Arg,

und

Peptide ausgewählt aus der Gruppe

HWWRRAESD-EARRSYNDPK-R²,
HWYRATSDGEARRSYADPTSR²,

mit der Maßgabe, dass pro Aminosäureposition in der Sequenz maximal zwei nichtkonservative Aminosäureaustausche vorgenommen werden, wobei unter nichtkonservativem Austausch ein Austausch von Aminosäuren zwischen den nachstehend genannten Gruppen verstanden wird:

Gruppe I: Leu, Ile, Val, Met, His, Trp, Tyr, Phe,

Gruppe II: Glu, Gln, Asp, Asn,

Gruppe III: Ser, Thr, Cys, Gly, Ala, Pro,

Gruppe IV: Lys, Arg.

4. Peptide nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um

TGSFF SELWT SGKK-amid oder freie Säure,

E YGSFF SELWT SGKK-amid oder freie Säure,

T YGTLF SDFWL SGKK-amid oder freie Säure,

His-Trp-Trp-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Ser-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Amid oder freie Säure,

Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Amid oder freie Säure,

D WGTLV SGFWE Y amid oder freie Säure,

D WGTLF SDFWQ TGKK amid oder freie Säure,

H WYRAT SDGEA RRSYA DPTSG KK-amid oder freie Säure,

HWWRAESDEARRSYNDPKC-amid oder freie Säure,

oder die jeweils N-terminal acetyliert sind,

handelt.

5. Peptide nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Peptide von Antikörpern von Patienten mit Dilatativer Cardiomyopathie gebunden werden.
6. Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Linker ausgewählt wird aus der Gruppe, bestehend aus
- α -Aminocarbonsäuren sowie deren Homo- und Heterooligomere
 - α,ω -Aminocarbonsäuren sowie deren verzweigte Homo- oder Heterooligomere

- sonstige Aminosäuren sowie die linearen und verzweigten Homo- oder Heterooligomere (Peptide)
 - Amino-oligoalkoxy-alkylamine
 - Maleinimidocarbonsäure- Derivate
 - Oligomere von Alkylaminen
 - 4-Alkylphenyl-Derivate
 - 4-Oligoalkoxyphenyl- oder 4-Oligoalkoxyphenoxy-Derivate
 - 4-Oligoalkylmercaptophenyl- oder 4-Oligoalkylmercaptophenoxy-Derivate
 - 4-Oligoalkylaminphenyl- oder 4-Oligoalkylaminyphenoxy-Derivate
 - (Oligoalkylbenzyl)-phenyl- oder 4-(Oligoalkylbenzyl)-phenoxy-Derivate sowie 4-(Oligoalkoxybenzyl)-phenyl- oder 4-(Oligoalkoxybenzyl)-phenoxy-Derivate
 - Trityl-Derivate
 - Benzyloxyaryl- oder Benzyloxyalkyl-Derivate
 - Xanthen-3-yl-oxyalkyl-Derivate
 - (4-Alkylphenyl)- oder ω -(4-Alkylphenoxy)-alkansäure-Derivate
 - Oligoalkyl-phenoxyalkyl- oder Oligoalkoxy-phenoxyalkyl-Derivate
 - Carbamat-Derivate
 - Amine
 - Trialkylsilyl- oder Dialkyl-alkoxysilyl-Derivate
 - Alkyl- oder Aryl-Derivate
 - und Kombinationen davon.
7. Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Peptide an eine Festphase gebunden sind.
8. Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Peptide über den Spacer an eine Festphase gebunden sind.
9. Arzneimittel enthaltend die Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 8.

10. Verwendung der Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung mit von mit β_1 -adrenerg aktiven Autoantikörpern in Verbindung stehenden Erkrankungen, insbesondere Dilatative Cardiomyopathie.
11. Verfahren zur Behandlung von mit β_1 -adrenerg aktiven Autoantikörpern in Verbindung stehenden Erkrankungen durch Entfernung der Autoantikörper mittels von an eine Festphase gebundenen Peptiden nach Anspruch 6 oder 7.
12. Vorrichtung zur Chromatographie enthaltend an eine Festphase gebundene Peptide nach Anspruch 6 oder 7.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/09241

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/705 C07K7/08 A61P37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, MEDLINE, WPI Data, CHEM ABS Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	G SCHNEIDER ET AL: "Peptide design by artificial neural networks and computer-based evolutionary search" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, US, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, vol. 95, no. 21, 13 October 1998 (1998-10-13), pages 12179-12184-12184, XP002127398 ISSN: 0027-8424 figure 1 --- -/--	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 February 2001

Date of mailing of the international search report

12/02/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cervigni, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/09241

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>LIU H R ET AL.: "SCREENING OF SERUM AUTOANTIBODIES TO CARDIAC BETA1-ADRENOCEPTORS AND M2-MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS IN 408 HEALTHY SUBJECTS OF VARYING AGES"</p> <p>AUTOIMMUNITY (1999) 29 (1) 43-51, XP000929153 table II</p>	
A	<p>ELIES R ET AL.: "STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE B CELL EPITOPES RECOGNIZED BY ANTI-RECEPTOR AUTOANTIBODIES IN PATIENTS WITH CHAGAS' DISEASE"</p> <p>JOURNAL OF IMMUNOLOGY (1996 NOV 1) 157 (9) 4203-11, XP002142657 figure 1</p>	
A	<p>WALLUKAT G ET AL.: "AGONISTIC EFFECTS OF ANTI-PEPTIDE ANTIBODIES AND AUTOANTIBODIES DIRECTED AGAINST ADRENERGIC AND CHOLINERGIC RECEPTORS ABSENCE OF DESENSITIZATION"</p> <p>BLOOD PRESSURE SUPPLEMENT (1996) 3 31-6, XP000929115 page 32, column 1</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/09241

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07K14/705 C07K7/08 A61P37/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, MEDLINE, WPI Data, CHEM ABS Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	G SCHNEIDER ET AL: "Peptide design by artificial neural networks and computer-based evolutionary search" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, US, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, Bd. 95, Nr. 21, 13. Oktober 1998 (1998-10-13), Seiten 12179-12184-12184, XP002127398 ISSN: 0027-8424 Abbildung 1 --- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. Februar 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

12/02/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Cervigni, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	LIU H R ET AL.: "SCREENING OF SERUM AUTOANTIBODIES TO CARDIAC BETA1-ADRENOCEPTORS AND M2-MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS IN 408 HEALTHY SUBJECTS OF VARYING AGES" AUTOIMMUNITY (1999) 29 (1) 43-51, XP000929153 Tabelle II ----	
A	ELIES R ET AL.: "STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE B CELL EPITOPES RECOGNIZED BY ANTI-RECEPTOR AUTOANTIBODIES IN PATIENTS WITH CHAGAS' DISEASE" JOURNAL OF IMMUNOLOGY (1996 NOV 1) 157 (9) 4203-11, XP002142657 Abbildung 1 ----	
A	WALLUKAT G ET AL.: "AGONISTIC EFFECTS OF ANTI-PEPTIDE ANTIBODIES AND AUTOANTIBODIES DIRECTED AGAINST ADRENERGIC AND CHOLINERGIC RECEPTORS ABSENCE OF DESENSITIZATION" BLOOD PRESSURE SUPPLEMENT (1996) 3 31-6, XP000929115 Seite 32, Spalte 1 -----	